

Metode pengujian cemaran mikroba dalam daging, telur dan susu, serta hasil olahannya



© BSN 2008

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Mangala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Singkatan.....	2
4 Metode pengujian	2
Lampiran A (normatif) <i>MPN</i> seri tiga tabung	31
Bibliografi.....	32
 Gambar 1 - CAMP test <i>Listeria monocytogenes</i>	 29
 Tabel 1 - Petunjuk penghitungan <i>TPC</i>	 6
Tabel 2 - Hasil reaksi Indole, Methyl Red, Voges- Proskauer, Citrate (IMViC) terhadap <i>E. coli</i>	 11
Tabel 3 - Hasil uji <i>Salmonella</i> sp pada <i>TSIA</i> dan <i>LIA</i>	16
Tabel 4 - Reaksi biokimia <i>Salmonella</i>	20
Tabel 5 - Kriteria penentuan non <i>Salmonella</i> spp	21
Tabel 6 - Perbandingan karakteristik spesies <i>Campylobacter</i>	26
Tabel 7 - Interpretasi hasil uji <i>Listeria monocytogenes</i>	30

Prakata

Standar metode pengujian cemaran mikroba ini meliputi *Total Plate Count* (TPC), *Coliform*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. dan *Listeria monocytogenes* dalam daging, telur dan susu, serta hasil olahannya,

Standar ini merupakan revisi dan penyempurnaan sebagian besar ruang lingkup pengujian dalam SNI 01-2897-1992 Cara uji cemaran mikroba, kecuali pengujian bakteri Enterococci, *Clostridium perfringes*, dan *Vibrio cholerae*, serta penambahan pengujian *Campylobacter* spp. dan *Listeria* spp. yang disesuaikan dengan perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi (IPTEK) yang berlaku pada saat ini. Standar ini disusun dan dirumuskan setelah melalui validasi pengujian di laboratorium kesehatan masyarakat veteriner.

Standar ini disusun dan dirumuskan oleh Panitia Teknis 67-03 Peternakan dan Produk Peternakan. Standar ini telah dibahas dalam rapat teknis pada tanggal 10 September 2007, dan terakhir disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 30 Oktober 2007 di Bogor yang dihadiri oleh anggota Panitia Teknis dan pihak terkait lainnya. Standar ini juga telah melalui tahap jajak pendapat pada tanggal 7 April 2008 sampai dengan 7 Juni 2008, namun untuk mencapai kuorum diperpanjang sampai dengan tanggal 7 Juli 2008 dan langsung disetujui menjadi RASNI.

SNI ini disusun untuk mendukung perundangan-undangan Negara Republik Indonesia yang berlaku di bidang keamanan pangan asal hewan.

Metode pengujian cemaran mikroba dalam daging, telur dan susu, serta hasil olahannya

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan metode pengujian cemaran mikroba *Total Plate Count* (TPC), *Coliform*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., dan *Listeria monocytogenes* secara kualitatif dan kuantitatif pada daging, telur dan susu, serta hasil olahannya.

2 Istilah dan definisi

2.1

cemaran mikroba

kontaminan jasad renik/mikroba pada daging, telur dan susu, serta hasil olahannya yang dapat merusak produk dan atau membahayakan kesehatan manusia

2.2

daging

bagian otot skeletal dari karkas ternak/hewan yang aman, layak dan lazim dikonsumsi oleh manusia, dapat berupa daging segar, daging segar dingin, atau daging beku

2.3

daging olahan

daging yang telah mengalami proses pengolahan

2.4

telur

telur yang dihasilkan oleh unggas yang belum mengalami proses pengolahan dan pengeraman untuk dikonsumsi manusia

2.5

telur olahan

telur yang telah mengalami proses pengolahan

2.6

susu

cairan yang berasal dari ambung ternak perah sehat dan bersih, yang diperoleh dengan cara pemerahan yang benar sesuai ketentuan yang berlaku, yang kandungan alaminya tidak dikurangi atau ditambah sesuatu apapun dan belum mendapat perlakuan apapun kecuali proses pendinginan

2.7

susu olahan

susu yang telah mengalami proses pengolahan

2.8

Most Probable Number (MPN)

perkiraan (estimasi) jumlah mikroba dalam suatu pangan, dengan memupuk pada suatu tingkat pengenceran ke dalam tiga atau lima tabung berisi media cair

2.9

Total Plate Count (TPC)

cara penghitungan jumlah mikroba yang terdapat dalam suatu produk yang tumbuh pada media agar pada suhu dan waktu inkubasi yang ditetapkan

3 Singkatan

- a) BPW 0,1%: *Buffered Pepton Water 0,1%*;
- b) BGLBB : *Brilliant Green Lactose Bile Broth*;
- c) BHI : *Brain Heart Infusion*;
- d) BHIB: *Brain Heart Infusion Broth*;
- e) BPA : *Baird-Parker Agar*;
- f) BSA : *Bismuth Sulfite Agar*;
- g) CFU : *Colony Forming Unit*;
- h) EDTA : *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*;
- i) ECB : *Escherichia Coli Broth*;
- j) *E.coli* : *Escherichia coli*;
- k) LEMBA : *Levine Eosin Methylene Blue Agar*;
- l) FBS : *Foetal Bovine Serum*;
- m) HEA : *Hektoen Enteric Agar*;
- n) IMViC: *Indole, Methylred, Voges Proskauer dan Citrate*;
- o) KCN : *Kalium Cyanide*;
- p) KCNB : *Kalium Cyanide Broth*;
- q) LIA : *Lysine Iron Agar*;
- r) LDB : *Lysine Decarboxylase Broth*;
- s) LB : *Lactose Broth*;
- t) LSTB : *Lauryl Sulfate Tryptose Broth*;
- u) MPN : *Most Probable Number*;
- v) MR-VP : *Methyl Red-Voges Proskauer*;
- w) PCA : *Plate Count Agar*;
- x) RV : *Rappaport Vassiliadis*;
- y) *S.aureus* : *Staphylococcus aureus*;
- z) SCB : *Selenite Cystine Broth*;
- aa) TPC : *Total Plate Count*;
- bb) TSIA : *Triple Sugar Iron Agar*;
- cc) TTB : *Tetra Thionate Broth*;
- dd) TSTB : *Trypticase Soy Tryptose Broth*;
- ee) TB : *Tryptose Broth*;
- ff) XLDA: *Xylose Lysine Deoxycholate Agar*;
- gg) KCB : *Koser Citrate Broth*;
- hh) SCA : *Simmons Citrate Agar*.

4 Metode pengujian

4.1 Pengujian **Total Plate Count (TPC)**

4.1.1 Prinsip

Total Plate Count (TPC) dimaksudkan untuk menunjukkan jumlah mikroba yang terdapat dalam suatu produk dengan cara menghitung koloni bakteri yang ditumbuhkan pada media agar.

4.1.2 Media dan reagen

- a) PCA;
- b) BPW 0,1%.

4.1.3 Peralatan

- a) cawan petri;
- b) tabung reaksi;
- c) pipet volumetrik;
- d) botol media;
- e) penghitung koloni (*colony counter*);
- f) gunting;
- g) pinset;
- h) jarum inokulasi (ose);
- i) *stomacher*;
- j) pembakar bunsen;
- k) pH meter;
- l) timbangan;
- m) *magnetic stirer*;
- n) pengocok tabung (*vortex*);
- o) inkubator;
- p) penangas air;
- q) autoklaf;
- r) lemari steril (*clean bench*);
- s) lemari pendingin (*refrigerator*);
- t) *freezer*.

4.1.4 Penyiapan contoh

- a) Timbang contoh padat dan semi padat sebanyak 25 g atau ukur contoh cair sebanyak 25 ml secara aseptik, kemudian masukkan dalam wadah steril.
- b) Untuk contoh daging, telur dan susu
 Tambahkan 225 ml larutan BPW 0.1 % steril ke dalam kantong steril yang berisi contoh, homogenkan dengan *stomacher* selama 1 menit sampai dengan 2 menit (kecuali untuk contoh susu cair). Ini merupakan larutan dengan pengenceran 10^{-1} .

4.1.5 Cara uji

- a) Pindahkan 1 ml suspensi pengenceran 10^{-1} tersebut dengan pipet steril ke dalam larutan 9 ml BPW untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} .
- b) Buat pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} dan seterusnya dengan cara yang sama seperti pada butir a), sesuai kebutuhan.
- c) Selanjutnya masukkan sebanyak 1 ml suspensi dari setiap pengenceran ke dalam cawan petri secara duplo.
- d) Tambahkan 15 ml sampai dengan 20 ml PCA yang sudah didinginkan hingga temperatur $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pada masing-masing cawan yang sudah berisi suspensi. Supaya larutan contoh dan media PCA tercampur seluruhnya, lakukan pemutaran cawan ke depan dan ke belakang atau membentuk angka delapan dan diamkan sampai menjadi padat.

- e) Inkubasikan pada temperatur 34 °C sampai dengan 36 °C selama 24 jam sampai dengan 48 jam dengan meletakkan cawan pada posisi terbalik.
- f) Khusus untuk produk susu, inkubasikan pada temperatur 32 °C ± 1 °C selama 24 jam sampai dengan 48 jam dengan meletakkan cawan pada posisi terbalik.

4.1.6 Penghitungan jumlah koloni

Hitung jumlah koloni pada setiap seri pengenceran kecuali cawan petri yang berisi koloni menyebar (*spreader colonies*). Pilih cawan yang mempunyai jumlah koloni 25 sampai dengan 250.

4.1.7 Interpretasi hasil

4.1.7.1 Cawan dengan jumlah koloni kurang dari 25

Bila cawan duplo dari pengenceran terendah menghasilkan koloni kurang dari 25, hitung jumlah yang ada pada cawan dari setiap pengenceran.

Rerata jumlah koloni per cawan dan kalikan dengan faktor pengencerannya untuk menentukan nilai *TPC*.

Tandai nilai *TPC* dengan tanda bintang (Tabel 1 nomor 3) untuk menandai bahwa penghitungannya diluar 25 koloni sampai dengan 250 koloni per cawan.

4.1.7.2 Cawan dengan jumlah koloni lebih dari 250

Bila jumlah koloni per cawan lebih dari 250, hitung koloni-koloni pada cawan untuk memberikan gambaran penyebaran koloni secara representatif. Tandai penghitungan *TPC* dengan tanda bintang untuk menandai bahwa penghitungannya diluar 25 koloni sampai dengan 250 koloni per cawan (Tabel 1 nomor 4).

4.1.7.3 *Spreader*s

Koloni yang menyebar (*spreader*s) biasanya dibagi dalam 3 bentuk:

- a) Rantai koloni tidak terpisah secara jelas disebabkan oleh disintegrasi rumpun bakteri.
- b) Terbentuknya lapisan air antara agar dan dasar cawan.
- c) Terbentuknya lapisan air pada sisi atau permukaan agar.

Bila cawan yang disiapkan untuk contoh lebih banyak ditumbuhi oleh *spreader* seperti (a), dan total area yang melebihi 25 % dan 50 % pertumbuhannya dilaporkan sebagai cawan *spreader*.

Rerata jumlah koloni dari setiap pengenceran, kemudian laporkan jumlahnya sebagai *TPC* (Tabel 1 nomor 5).

Selain 3 (tiga) bentuk *spreader*, dapat dihitung sebagai satu pertumbuhan koloni.

Untuk tipe a) bila hanya terdapat satu rantai, hitunglah sebagai koloni tunggal. Bila ada satu atau lebih rantai yang terlihat dari sumber lain, hitung tiap sumber itu sebagai satu koloni, termasuk untuk tipe b) dan c) juga dihitung sebagai koloni.

Gabungkan perhitungan koloni dan perhitungan *spreader* untuk menghitung *TPC*.

4.1.7.4 Cawan tanpa koloni

Bila cawan petri dari semua pengenceran tidak menghasilkan koloni, laporkan *TPC* sebagai kurang dari 1 kali pengenceran terendah yang digunakan. Tandai *TPC* dengan tanda bintang bahwa penghitungannya diluar 25 koloni sampai dengan 250 koloni (Tabel 1 nomor 6).

4.1.7.5 Cawan duplo, cawan yang satu dengan 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan cawan yang lain lebih dari 250 koloni

Bila cawan yang satu menghasilkan koloni antara 25 sampai dengan 250 dan yang lain lebih dari 250 koloni, hitung kedua cawan dalam penghitungan *TPC* (Tabel 1 nomor 7).

4.1.7.6 Cawan duplo, satu cawan dari setiap pengenceran dengan 25 koloni sampai dengan 250 koloni

Bila 1 cawan dari setiap pengenceran menghasilkan 25 koloni sampai dengan 250 koloni, dan cawan lain kurang dari 25 koloni atau menghasilkan lebih dari 250 koloni, hitung keempat dalam penghitungan *TPC* (Tabel 1 nomor 8).

4.1.7.7 Cawan duplo, dua cawan dari satu pengenceran dengan 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hanya 1 cawan yang lebih dari 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan dari cawan yang lain dengan 25 koloni sampai dengan 250 koloni

Bila kedua cawan dari satu pengenceran menghasilkan 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung keempat cawan termasuk cawan yang kurang dari 25 atau yang lebih dari 250 koloni dalam penghitungan *TPC* (Tabel 1 nomor 9).

4.1.8 Pelaporan hasil

- Bulatkan angka menjadi 2 angka yang sesuai, bila angka ketiga 6 atau di atasnya, maka angka ketiga menjadi 0 (nol) dan angka kedua naik 1 angka, misalnya 456 menjadi 460 ($4,6 \times 10^2$).
- Bila angka ketiga 4 atau dibawahnya, maka angka ketiga menjadi 0 (nol) dan angka kedua tetap, misalnya 454 menjadi 450 ($4,5 \times 10^2$).
- Bila angka ketiga 5, maka angka tersebut dapat dibulatkan menjadi 0 (nol) dan angka kedua adalah angka genap, misalnya 445 menjadi 440 ($4,4 \times 10^2$).
- Bila angka ketiganya 5, maka angka tersebut dapat dibulatkan menjadi 0 (nol) dan angka kedua naik 1 angka, misalnya 455 menjadi 460 ($4,6 \times 10^2$).

Tabel 1 - Petunjuk penghitungan TPC

No	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	TPC per ml atau gram	Keterangan
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
1	=== ===	175 208	16 17	190.000	bila hanya satu pengenceran yang berada dalam batas yang sesuai, hitung jumlah rerata dari pengenceran tersebut.
2	=== ===	224 225	25 30	250.000	bila ada dua pengenceran yang berada dalam batas yang sesuai, hitung jumlah masing-masing dari pengenceran sebelum meratakan jumlah yang sebenarnya.
3	18 14	2 0	0 0	1.600*	Jumlah koloni kurang dari 25 koloni pada pengenceran terendah, hitung jumlahnya dan kalikan dengan faktor pengencerannya dan beri tanda * (diluar jumlah koloni 25 sampai dengan 250).
4	=== ===	==== ====	523 487	5.100.000	Jumlah koloni lebih dari 250 koloni, hitung koloni yang dapat dihitung atau yang mewakili beri tanda* (diluar jumlah koloni 25 sampai dengan 250).
5	=== ===	245 230	35 spreader	290.000	Bila ada dua pengenceran diantara jumlah koloni 25 sampai dengan 250, tetapi ada <i>spreader</i> , hitung jumlahnya dan kalikan dengan faktor pengenceran, namun untuk <i>spreader</i> tidak dihitung.
6	0 0	0 0	0 0	100*	Bila cawan tanpa koloni, jumlah TPC adalah kurang dari 1 kali pengenceran terendah yang digunakan, dan beri tanda*
7	=== ===	245 278	23 20	260.000	Jumlah koloni 25 sampai dengan 250, dan yang lain lebih dari 250 koloni, hitung kedua cawan petri termasuk yang lebih dari 250 koloni, dan rerata jumlahnya.
8	=== ===	225 255	21 40	270.000	Bila salah satu cawan dengan jumlah 25 koloni sampai dengan 250 koloni dari tiap pengenceran, hitung jumlah dari tiap pengenceran termasuk yang kurang dari 25 koloni, lalu rerata jumlah yang sebenarnya.
9	=== ===	220 240	18 48	260.0000	Bila hanya satu cawan yang menyimpang dari setiap pengenceran, hitung jumlah dari tiap pengenceran termasuk yang kurang dari 25 koloni atau lebih dari 250 koloni, kemudian rerata jumlah sebenarnya.
	=== ===	260 230	30 28	270.000	

4.2 Pengujian *Most Probable Number (MPN) Coliform*

4.2.1 Prinsip

Metode *Most Probable Number (MPN)* terdiri dari uji *presumtif* (penduga) dan uji konfirmasi (peneguhan), dengan menggunakan media cair di dalam tabung reaksi dan dilakukan berdasarkan jumlah tabung positif. Pengamatan tabung positif dapat dilihat dengan timbulnya gas di dalam tabung *Durham*.

4.2.2 Media dan reagen

- a) larutan *BPW* 0,1 %;
- b) *BGLBB*;
- c) *LSTB*.

4.2.3 Peralatan

- a) tabung Durham;
- b) tabung reaksi;
- c) pipet ukuran 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml;
- d) botol media;
- e) gunting;
- f) pinset;
- g) jarum inokulasi (ose);
- h) *stomacher*;
- i) pembakar bunsen;
- j) pH meter;
- k) timbangan;
- l) *magnetic stirrer*;
- m) pengocok tabung (vortex);
- n) inkubator;
- o) penangas air;
- p) autoklaf;
- q) lemari steril (*clean bench*);
- r) lemari pendingin (refrigerator);
- s) *freezer*.

4.2.4 Penyiapan contoh

- a) Timbang contoh padat dan semi padat sebanyak 25 g atau ukur contoh cair sebanyak 25 ml secara aseptik kemudian masukkan dalam wadah steril.
- b) Untuk contoh daging, telur dan susu
 Tambahkan 225 ml larutan *BPW* 0,1 % steril ke dalam kantong steril yang berisi contoh, homogenkan dengan *stomacher* selama 1 menit sampai dengan 2 menit (kecuali untuk contoh susu cair). Ini merupakan larutan dengan pengenceran 10^{-1} .

4.2.5 Cara uji

Pengujian menggunakan seri 3 tabung.

4.2.5.1 Uji pendugaan

- a) Pindahkan 1 ml larutan pengenceran 10^{-1} tersebut dengan pipet steril ke dalam larutan 9 ml *BPW* 0,1 % untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} . Dengan cara yang sama seperti di atas dibuat pengenceran 10^{-3} .
- b) Pipet masing-masing 1 ml dari setiap pengenceran ke dalam 3 seri tabung *LSTB* yang berisi tabung *Durham*.
- c) Inkubasi pada temperatur 35 °C selama 24 jam sampai dengan 48 jam.
- d) Perhatikan adanya gas yang terbentuk di dalam tabung *Durham*. Hasil uji dinyatakan positif apabila terbentuk gas.

4.2.5.2 Uji konfirmasi (peneguhan)

- Pengujian selalu disertai dengan kontrol positif.
- Pindahkan biakan positif dari 4.2.5.1 d) dengan menggunakan jarum inokulasi dari setiap tabung *LSTB* ke dalam tabung *BGLBB* yang berisi tabung *Durham*.
- Inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 48 jam ± 2 jam.
- Perhatikan adanya gas yang terbentuk di dalam tabung *Durham*. Hasil uji dinyatakan positif apabila terbentuk gas.
- Selanjutnya gunakan tabel *Most Probable Number (MPN)* untuk menentukan nilai *MPN* berdasarkan jumlah tabung *BGLBB* yang positif sebagai jumlah koliform per mililiter atau per gram.

4.2.6 Interpretasi hasil

Banyaknya koliform yang terdapat dalam contoh uji diinterpretasikan dengan mencocokkan kombinasi jumlah tabung yang memperlihatkan hasil positif, berdasarkan tabel nilai *MPN* (Lampiran A). Kombinasi yang diambil, dimulai dari pengenceran tertinggi yang masih menghasilkan semua tabung positif, sedangkan pada pengenceran berikutnya terdapat tabung yang negatif. Kombinasi yang diambil terdiri dari tiga pengenceran. Nilai *MPN* contoh dihitung sebagai berikut:

$$MPN \text{ contoh (MPN/ml atau MPN/g)} = \frac{\text{nilai MPN tabel}}{100} \times \text{faktor pengenceran yang di tengah}$$

4.3 Pengujian *MPN Escherichia coli*

4.3.1 Prinsip

Pengujian dilakukan dengan uji pendugaan, uji peneguhan dan isolasi-identifikasi melalui uji biokimia *Indole*, *Methyl red*, *Voges-Proskauer* dan *Citrate (IMViC)*.

4.3.2 Media dan reagensia

- BPW* 0,1 %;
- BGLBB*;
- LSTB*;
- ECB*;
- L-EMBA*;
- MR-VP*;
- PCA*;
- KCB*;
- SCA*;
- Reagen Kovas;
- Reagen *Voges-Proskauer (VP)*.

4.3.3 Peralatan

- a) tabung Durham;
- b) cawan Petri;
- c) tabung reaksi;
- d) pipet ukuran 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml;
- e) botol media;
- f) gunting;
- g) pinset;
- h) jarum inokulasi (ose);
- i) *stomacher*;
- j) pembakar bunsen;
- k) pH meter;
- l) timbangan;
- m) *magnetic stirrer*;
- n) pengocok tabung (vortex);
- o) inkubator;
- p) penangas air;
- q) autoklaf;
- r) lemari steril (*clean bench*);
- s) lemari pendingin (refrigerator);
- t) *freezer*.

4.3.4 Penyiapan contoh

- a) Timbang contoh padat dan semi padat sebanyak 25 g atau ukur contoh cair sebanyak 25 ml secara aseptik kemudian masukkan dalam wadah steril.
- b) Untuk contoh daging, telur dan susu
 Tambahkan 225 ml larutan *BPW* 0,1 % ke dalam kantong steril yang berisi contoh, homogenkan dengan *stomacher* selama 1 menit sampai dengan 2 menit (kecuali untuk contoh susu cair). Ini merupakan larutan dengan pengenceran 10^{-1} .

4.3.5 Cara uji

Pengujian menggunakan seri 3 tabung, uji isolasi-identifikasi, dan uji biokimia.

4.3.5.1 Seri 3 tabung

4.3.5.1.1 Uji pendugaan

- a) Pindahkan 1 ml larutan pengenceran 10^{-1} tersebut dengan pipet steril ke dalam larutan 9 ml *BPW* 0,1 % untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} . Dengan cara yang sama seperti di atas dibuat pengenceran 10^{-3} .
- b) Pipet masing-masing 1 ml dari setiap pengenceran ke dalam 3 seri tabung *LSTB* yang berisi tabung *Durham*.
- c) Inkubasi pada temperatur 35 °C selama 24 jam sampai dengan 48 jam.
- d) Perhatikan adanya gas yang terbentuk di dalam tabung *Durham*. Hasil uji dinyatakan positif apabila terbentuk gas.

4.3.5.1.2 Uji konfirmasi (peneguhan)

- Pengujian harus selalu disertai dengan menggunakan kontrol positif.
- Pindahkan biakan positif dari 4.3.5.1.1 d) dengan menggunakan jarum inokulasi dari setiap tabung *LSTB* ke dalam tabung *ECB* yang berisi tabung *Durham*.
- Inkubasikan *ECB* pada temperatur 45,5 °C selama 24 jam ± 2 jam, jika hasilnya negatif inkubasikan kembali selama 48 jam ± 2 jam.
- Perhatikan adanya gas yang terbentuk di dalam tabung *Durham*. Hasil uji dinyatakan positif apabila terbentuk gas.
- Selanjutnya gunakan tabel *Most Probable Number (MPN)* untuk menentukan nilai *MPN* berdasarkan jumlah tabung *ECB* yang positif mengandung gas di dalam tabung *Durham* sebagai jumlah *E.coli* per mililiter atau per gram.

4.3.5.1.3 Interpretasi hasil

Banyaknya koliform yang terdapat dalam contoh uji diinterpretasikan dengan mencocokkan kombinasi jumlah tabung yang memperlihatkan hasil positif, berdasarkan tabel nilai *MPN* (Lampiran A). Kombinasi yang diambil, dimulai dari pengenceran tertinggi yang masih menghasilkan semua tabung positif, sedangkan pada pengenceran berikutnya terdapat tabung yang negatif. Kombinasi yang diambil terdiri dari tiga pengenceran. Nilai *MPN* contoh dihitung sebagai berikut :

$$MPN \text{ contoh } (MPN/ml \text{ atau } MPN/g) = \frac{\text{nilai } MPN \text{ tabel}}{100} \times \text{faktor pengenceran yang di tengah}$$

4.3.5.2 Isolasi-identifikasi

- Buat goresan pada media *L-EMBA* atau *VRBA* dari tabung *ECB* yang positif, inkubasi pada temperatur 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam.
- Koloni yang diduga *E. coli* berdiameter 2 mm sampai dengan 3 mm, warna hitam atau gelap pada bagian pusat koloni, dengan atau tanpa metalik kehijauan yang mengkilat pada media *L-EMBA*.
- Ambil koloni yang diduga dari masing-masing media *L-EMBA* dengan menggunakan ose, dan pindahkan ke *PCA* miring. Inkubasikan *PCA* miring pada temperatur 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam untuk uji biokimia.

4.3.5.3 Uji biokimia dengan uji *IMViC*.

4.3.5.3.1 Uji produksi *indole*

- Inokulasikan koloni dari tabung *PCA* pada *TB* dan inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 24 jam ± 2 jam.
- Tambahkan 0,2 ml sampai dengan 0,3 ml reagen *Kovac*.
- Hasil reaksi positif ditandai dengan adanya bentuk cincin merah pada lapisan atas media, sedangkan hasil reaksi negatif ditandai dengan terbentuknya cincin kuning.

4.3.5.3.2 Uji Voges-Proskauer (VP)

- Ambil biakan dari media *PCA* lalu inokulasikan ke tabung yang berisi 10 ml media *MR-VP* dan inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 48 jam ± 2 jam.
- Pindahkan 5 ml *MR-VP* ke tabung reaksi dan tambahkan 0.6 ml larutan α-naphthol dan 0.2 ml KOH 40 %, kemudian digoyang-goyang.
- Hasil reaksi positif ditandai adanya warna merah muda eosin dalam waktu 2 jam.

4.3.5.3.3 Uji Methyl Red (MR)

- Ambil biakan dari media *PCA* lalu inokulasikan ke tabung yang berisi 10 ml media *MR-VP* dan inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 48 jam ± 2 jam.
- Tambahkan 2 tetes sampai dengan 5 tetes indikator *MR* pada tabung.
- Hasil uji positif ditandai adanya warna merah dan hasil reaksi negatif ditandai adanya warna kuning.

4.3.5.3.4 Uji citrate

- Inokulasikan koloni dari media Agar miring *PCA* ke dalam media *KCB*, dan inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 96 jam.
- Hasil uji positif ditandai dengan terbentuknya kekeruhan pada media.

4.3.5.3.5 Interpretasi hasil uji biokimia

Klasifikasi *E. coli* adalah

Reaksi *IMViC* dengan pola + + - - atau - + - - (Tabel 2),

Tabel 2 - Hasil reaksi Indole, Methyl Red, Voges- Proskauer, Citrate (IMViC) terhadap *E. coli*

Tipe Organisme	Indol	MR	VP	Citrate
<i>E. coli</i> spesifik	+	+	-	-
<i>E. coli</i> non spesifik	-	+	-	-
<i>Typical intermediate</i>	N/A	+	-	+
<i>Atypical intermediate</i>	-	+	-	+
<i>Typical Enterobacter aerogenes</i>	-	-	+	+
<i>Atypical Enterobacter aerogenes</i>	+	-	+	+

4.3.6 Interpretasi hasil akhir

Jumlah *E. coli* dinyatakan berdasarkan hasil *MPN*, Isolasi - identifikasi, dan uji biokimia.

4.4 Pengujian jumlah *Staphylococcus aureus*

4.4.1 Prinsip

Metode yang digunakan adalah dengan hitung cawan secara sebar pada permukaan media.

4.4.2 Media dan reagensia

- a) *BPA*;
- b) *Egg yolk tellurite emulsion*;
- c) *BHIB*;
- d) *TSA*;
- e) koagulase plasma kelinci (*coagulate rabbit plasma*) dengan *EDTA* 0,1 %;
- f) *BPW* 0,1 %.

4.4.3 Peralatan

- a) cawan petri;
- b) tabung reaksi;
- c) pipet ukuran 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml;
- d) botol media;
- e) batang gelas bengkok (*hockey stick*);
- f) gunting;
- g) pinset;
- h) jarum inokulasi (*ose*);
- i) *stomacher*;
- j) pembakar bunsen;
- k) pH meter;
- l) timbangan;
- m) *magnetic stirrer*;
- n) pengocok tabung (*vortex*);
- o) inkubator;
- p) penangas air;
- q) autoklaf;
- r) lemari steril (*clean bench*);
- s) lemari pendingin (*refrigerator*);
- t) *freezer*.

4.4.4 Penyiapan contoh

- a) Untuk contoh susu (cair)
Contoh yang diuji dimulai dari pengenceran 10^0 (contoh tanpa pengenceran), kemudian dibuat seri pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , dan seterusnya.
- b) Untuk contoh daging, telur dan susu (padat dan semi padat)
Timbang contoh padat dan semi padat sebanyak 25 g atau ukur contoh cair sebanyak 25 ml, secara aseptik kemudian masukkan dalam wadah steril.
- c) Tambahkan 225 ml larutan *BPW* steril ke dalam kantong steril yang berisi contoh, lalu homogenkan dengan *stomacher* selama 1 menit sampai dengan 2 menit. Ini merupakan larutan dengan pengenceran 10^{-1} , kemudian dibuat pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , dan seterusnya.

4.4.5 Cara uji

- a) Pengujian selalu disertai dengan menggunakan kontrol positif.
- b) Pindahkan 1 ml contoh dari 10^0 ke dalam larutan 9 ml *BPW* untuk mendapatkan pengenceran 10^{-1} . Dengan cara yang sama dibuat pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , dan seterusnya.
Untuk contoh susu cair dimulai dari pengenceran 10^{-0} , sedangkan untuk contoh daging, telur, dan susu (padat dan semi padat) mulai pengenceran 10^{-1} .
- c) Tuang 15 ml sampai dengan 20 ml media *BPA* yang sudah ditambah dengan *egg yolk tellurite emulsion* (5 ml ke dalam 95 ml media *BPA*) pada masing-masing cawan yang akan digunakan dan biarkan sampai memadat.
- d) Pipet 1 ml suspensi dari setiap pengenceran, dan diinokulasikan masing-masing 0,4 ml, 0,3 ml, dan 0,3 ml pada 3 cawan petri yang berisi media pada huruf c di atas.
- e) Ratakan suspensi contoh di atas permukaan media agar dengan menggunakan batang gelas (*hockey stick*), dan biarkan sampai suspensi terserap.
- f) Inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 45 jam sampai dengan 48 jam pada posisi terbalik.
- g) Pilih cawan petri yang mengandung jumlah koloni 20 sampai dengan 200. Apabila cawan petri pada pengenceran terendah berisi < 20 koloni dan atau > 200 koloni, maka lanjutkan penghitungan koloni pada cawan petri dengan pengenceran yang lebih tinggi.
- h) Koloni *S. aureus* mempunyai ciri khas bundar, licin dan halus, cembung, diameter 2 mm sampai dengan 3 mm, berwarna abu-abu sampai hitam pekat, dikelilingi zona opak, dengan atau tanpa zona luar yang terang (*clear zone*). Tepi koloni putih dan dikelilingi daerah yang terang. Konsistensi koloni seperti mentega atau lemak jika disentuh oleh ose. Galur non-lipolitik memiliki sifat koloni sama seperti di atas, tetapi tidak dikelilingi zona opak dan zona luar yang terang.
- i) Catat jumlah masing-masing koloni yang mempunyai ciri seperti pada h).
- j) Ambil satu atau lebih koloni dari masing-masing bentuk yang tumbuh dan lakukan uji identifikasi.

4.4.6 Uji identifikasi

4.4.6.1 Pengecatan *Gram*

Ambil satu atau lebih koloni dari masing-masing bentuk koloni yang tumbuh dan lakukan Pengecatan *Gram*. Hasil Pengecatan gram akan terlihat bakteri berbentuk kokus berwarna ungu (*Gram* positif), bergerombol seperti anggur atau terlihat hanya satu bakteri.

4.4.6.2 Uji koagulase

- a) Ambil satu atau lebih koloni yang diduga *Staphylococcus aureus* dan masukkan ke dalam 0,2 ml sampai 0,3 ml *BHIB* dan homogenkan.
- b) Ambil satu ose penuh (diameter 3,0 mm) suspensi dari *BHIB* dan goreskan pada Agar miring *TSA*.

- c) Inkubasikan *BHIB* dan Agar miring *TSA* pada temperatur 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam.
- d) Tambahkan 0,5 ml koagulase plasma kelinci (*coagulase rabbit plasma*) yang mengandung *EDTA* ke dalam suspensi *BHIB* yang telah diinkubasi kemudian homogenkan.
- e) Inkubasikan tabung pada temperatur 35 °C selama 6 jam dan amati setiap jam terhadap pembentukan gumpalan.
- f) Hasil uji koagulase positif *Staphylococcus aureus* ditandai dengan adanya penggumpalan.

4.4.7 Perhitungan

- a) Hitung koloni-koloni dari cawan petri yang menunjukkan koloni khas *Staphylococcus aureus* dan menunjukkan hasil uji koagulase positif, kemudian dikalikan dengan faktor pengencerannya.
- b) Hasil dilaporkan sebagai jumlah *Staphylococcus aureus* per mililiter atau per gram.

4.5 Pengujian *Salmonella* spp.

4.5.1 Prinsip

Pertumbuhan *Salmonella* pada media selektif dengan pra pengayaan (*pre-enrichment*), dan pengayaan (*enrichment*) yang dilanjutkan dengan uji biokimia dan uji serologi.

4.5.2 Media dan reagen

- a) *LB*;
- b) *SCB*;
- c) *TTB*;
- d) *RV*;
- e) *XLDA*;
- f) *HEA*;
- g) *BSA*;
- h) *TSIA*;
- i) *LIA*;
- j) *LDB*;
- k) *KCNB*;
- l) *MR-VP*;
- m) *SCB*;
- n) *TB*;
- o) *TSTB*;
- p) *SIM*;
- q) *Reagen Kovac*;
- r) *BHI*;
- s) *Urea Broth*;
- t) *Malonate Broth*;
- u) *Phenol Red Lactose Broth*;
- v) *Phenol Red Sucrose Broth*;
- w) kristal keratin;

- x) Larutan Bromcresol Purple Dye 0,2 %;
- y) Larutan Physiological Saline 0,85 %;
- z) Larutan Formalinized Physiological Saline;
- aa) Salmonella Polyvalent Somatic (O) Antiserum A-S;
- bb) Salmonella Polyvalent Flagellar (H) Antiserum Fase 1 Dan 2;
- cc) Salmonella Somatic Grup (O) Monovalent Antisera : Vi.

4.5.3 Peralatan

- a) cawan petri;
- b) tabung reaksi;
- c) tabung serologi ukuran 10 x 75 mm;
- d) pipet ukuran 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml;
- e) botol media;
- f) gunting;
- g) pinset;
- h) jarum inokulasi (ose);
- i) stomacher;
- j) pembakar bunsen;
- k) pH meter;
- l) timbangan;
- m) magnetic stirrer;
- n) pengocok tabung (vortex);
- o) inkubator;
- p) penangas air;
- q) autoklaf;
- r) lemari steril (*clean bench*);
- s) lemari pendingin (refrigerator);
- t) freezer.

4.5.4 Cara uji

Setiap proses pengujian selalu disertai dengan menggunakan kontrol positif.

4.5.4.1 Pra-pengayaan

- a) Timbang contoh padat dan semi padat sebanyak 25 g atau ukur sebanyak 25 ml contoh cair secara aseptik kemudian masukkan dalam wadah steril.
- b) Untuk contoh daging, telur, dan susu
Tambahkan 225 ml larutan *LB* ke dalam kantong steril yang berisi contoh, homogenkan dengan *stomacher* selama 1 menit sampai dengan 2 menit (kecuali untuk contoh susu cair).
- c) Pindahkan suspensi ke dalam *Erlenmeyer* atau wadah steril.
- d) Inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 24 jam ± 2 jam.

4.5.4.2 Pengayaan

- a) Aduk perlahan biakan pra-pengayaan kemudian ambil dan pindahkan masing-masing 1 ml ke dalam media 10 ml *TTB*, sedangkan untuk media *RV* pindahkan 0,1 ml ke dalam 10 ml *RV*.

- b) Contoh dengan dugaan cemaran *Salmonella* spp. tinggi (*high microbial load*). Inkubasikan media *RV* pada temperatur $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam \pm 2 jam. Sedangkan untuk media *TTB* inkubasi pada temperatur $43\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam \pm 2 jam.
- c) Contoh dengan dugaan cemaran *Salmonella* spp. rendah (*low microbial load*). Inkubasikan media *RV* pada temperatur $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam \pm 2 jam. Sedangkan untuk media *TTB* inkubasi pada temperatur $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam \pm 2 jam.

4.5.4.3 Isolasi dan identifikasi

- a) Ambil dua atau lebih koloni dengan jarum ose dari masing-masing media pengayaan yang telah diinkubasikan, dan inokulasikan pada media *HE*, *XLD* dan *BSA*. Inkubasikan pada temperatur $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam \pm 2 jam. Untuk *BSA* apabila belum jelas dapat dinkubasikan lagi selama 24 jam \pm 2 jam.
- b) Amati koloni *Salmonella* pada media *HE* terlihat berwarna hijau kebiruan dengan atau tanpa titik hitam (H_2S).
- c) Pada media *XLD* koloni terlihat merah muda dengan atau tanpa titik mengkilat atau terlihat hampir seluruh koloni hitam.
- d) Pada media *BSA* koloni terlihat keabu-abuan atau kehitaman, kadang metalik, media di sekitar koloni berwarna coklat dan semakin lama waktu inkubasi akan berubah menjadi hitam.
- e) Lakukan identifikasi dengan mengambil koloni yang diduga dari ketiga media tersebut. Inokulasikan ke *TSIA* dan *LIA* dengan cara menusuk ke dasar media agar, selanjutnya digores pada media agar miring.
- f) Inkubasikan pada temperatur $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam \pm 2 jam. Amati koloni spesifik *Salmonella* dengan hasil reaksi seperti tercantum pada Tabel 3.

Tabel 3 - Hasil uji *Samonella* sp pada *TSIA* dan *LIA*

Media	Agar miring (<i>Slant</i>)	dasar Agar (<i>Buttom</i>)	H_2S	Gas
<i>TSIA</i>	Alkalin / K (merah)	Asam / A (kuning)	Positif (hitam)	Negatif/ positif
<i>LIA</i>	Alkalin / K (ungu)	Alkalin / K (ungu)	Positif (hitam)	Negatif/ Positif

4.5.4.4 Uji biokimia

4.5.4.4.1 Uji *urease*

- a) Inokulasikan koloni dari positif *TSIA* dengan ose ke *Urea Broth*.
- b) Inkubasikan pada temperatur $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam \pm 2 jam.
- c) Hasil uji spesifik *Salmonella* adalah negatif uji *urease*.

4.5.4.4.2 Uji indole

- a) Inokulasikan koloni dari media *TSIA* pada *TB* dan inkubasi pada temperatur 35 °C selama 24 jam ± 2 jam.
- b) Tambahkan 0,2 ml sampai dengan 0,3 ml *Reagen Kovacs*.
- c) Hasil uji positif ditandai dengan adanya cincin merah dipermukaan media.
- d) Hasil uji negatif ditandai dengan terbentuknya cincin kuning.
- e) Hasil uji spesifik *Salmonella* adalah negatif uji *indole*.

4.5.4.4.3 Uji Voges-Proskauer (VP)

- a) Ambil biakan dari media *TSIA* dengan ose lalu inokulasikan ke tabung yang berisi 10 ml media *MR-VP* dan inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 48 jam ± 2 jam.
- b) Pindahkan 5 ml *MR-VP* ke dalam tabung reaksi dan tambahkan 0.6 ml larutan α-naphthol dan 0,2 ml KOH 40 %, kemudian digoyang-goyang sampai tercampur dan didiamkan.
- c) Untuk mempercepat reaksi tambahkan kristal kreatin. Baca hasil setelah 4 jam.
- d) Hasil uji positif apabila terjadi perubahan warna pink sampai merah delima.
- e) Umumnya *Salmonella* memberikan hasil negatif untuk uji *VP* (tidak terjadi perubahan warna pada media).

4.5.4.4.4 Uji Methyl Red (MR)

- a) Ambil biakan dari media *TSIA* dengan ose inokulasikan ke dalam tabung yang berisi 10 ml media *MR-VP* dan inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 48 jam ± 2 jam.
- b) Tambah 5 tetes sampai dengan 6 tetes indikator *Methyl Red* pada tabung.
- c) Hasil uji positif ditandai dengan adanya difusi warna merah ke dalam media.
- d) Hasil uji negatif ditandai dengan terjadinya warna kuning pada media.
- e) Umumnya *Salmonella* memberikan hasil positif untuk uji *MR*.

4.5.4.4.5 Uji citrate

- a) Inokulasikan koloni dari *TSIA* ke dalam *SCA* dengan ose.
- b) Inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 96 jam ± 2 jam.
- c) Hasil uji positif ditandai adanya pertumbuhan koloni yang diikuti perubahan warna dari hijau menjadi biru.
- d) Hasil uji negatif ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni atau tumbuh sangat sedikit dan tidak terjadi perubahan warna.
- e) Umumnya *Salmonella* memberikan hasil positif pada uji *citrate*.

4.5.4.4.6 Uji *Lysine Decarboxylase Broth* (LDB)

- a) Ambil satu ose koloni dari *TSIA* dan inokulasikan ke dalam *LDB*.
- b) Inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 48 jam ± 2 jam dan diamati setiap 24 jam.
- c) *Salmonella* memberikan reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna ungu pada seluruh media dan hasil reaksi negatif memberikan warna kuning.
- d) Jika hasil reaksi meragukan (bukan ungu atau bukan kuning) tambahkan beberapa tetes 0,2 % *bromcresol purple dye* dan amati perubahan warnanya.

4.5.4.4.7 Uji Kalium *Cyanida* (KCN)

- a) Inokulasikan satu ose biakan dari *TSIA* ke media *TB*.
- b) Inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 24 jam ± 2 jam.
- c) Ambil satu ose koloni dari *TB* dan inokulasikan ke dalam *KCNB*.
- d) Inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 48 jam ± 2 jam.
- e) Hasil uji positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan yang ditandai dengan kekeruhan.
- f) Hasil uji negatif ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan pada media.
- g) *Salmonella* memberikan hasil negatif pada uji *KCN*.

4.5.4.4.8 Uji gula-gula

a) *Phenol red dulcitol broth* atau *purple broth base* dengan 0,5 % *dulcitol*

- Ambil koloni dari *TSIA* dan inokulasikan pada medium *dulcitol broth*.
- Inkubasikan pada temperatur 35 °C dan diamati setiap 24 jam selama 48 jam ± 2 jam.
- Kebanyakan *Salmonella* memberikan reaksi positif ditandai dengan pembentukan gas dalam tabung *Durham* dan warna kuning (pH asam) pada media.
- Hasil reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung *Durham* dan pada media terbentuk warna merah (pH basa) untuk indikator *phenol red* atau ungu untuk indikator *bromcresol purple*.

b) Uji *malonate broth*

- Pindahkan satu ose dari *TB* ke dalam *malonate broth*.
- Inkubasikan pada temperatur 35 °C dan diamati setiap 24 jam selama 48 jam ± 2 jam.
- Hasil uji positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi biru.
- *Salmonella* memberikan reaksi negatif yang ditandai dengan adanya warna hijau atau tidak ada perubahan warna.

c) Uji *phenol red lactose broth*

- Inokulasikan koloni dari *TSIA* miring ke dalam *Phenol red lactose broth*.
- Inkubasikan pada temperatur 35 °C dan diamati setiap 24 jam selama 48 jam ± 2 jam.
- Hasil reaksi positif ditandai dengan produksi asam (warna kuning) dengan atau tanpa gas
- *Salmonella* memberikan hasil reaksi negatif ditandai dengan tidak ada perubahan warna dan pembentukan gas.

d) Uji *phenol red sucrose broth*

- Inokulasikan koloni dari *TSIA* miring ke dalam *Phenol red sucrose broth*.
- Inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 48 jam ± 2 jam dan diamati setiap 24 jam.
- Hasil uji positif ditandai dengan adanya perubahan warna (kuning) dan dengan atau tanpa pembentukan gas.
- *Salmonella* memberikan hasil uji negatif ditandai dengan tidak ada perubahan warna dan pembentukan gas.

4.5.4.5 Uji serologis**4.5.4.5.1 Uji *polyvalent somatic (O)***

- Letakkan satu ose koloni dari *TSIA* atau *LIA* pada gelas preparat dan tambahkan satu tetes larutan garam fisiologis (NaCl 0,85 %) steril dan ratakan dengan kultur.
- Berikan satu tetes *Salmonella polyvalent somatic (O)* antiserum disamping suspensi koloni.
- Campur suspensi koloni ke antiserum sampai tercampur sempurna.
- Miringkan campuran tersebut ke kiri dan ke kanan dengan latar belakang gelap sambil diamati adanya reaksi aglutinasi.
- Siapkan kontrol dengan mencampur larutan garam fisiologis dan antiserum.
- Lakukan uji somatik (O) grup monovalent antisera Vi seperti uji polyvalent di atas.

4.5.4.5.2 Uji *polyvalent flagellar (H)*

- Koloni dari *TSIA* yang hasil uji *urease* negatif diinokulasi ke dalam *BHIB* dan diinkubasi pada temperatur 35 °C selama 4 jam sampai dengan 6 jam atau ke dalam *TSTB* dan inkubasi pada temperatur 35 °C selama 24 jam ± 2 jam.
- Tambahkan 2,5 ml larutan garam fisiologis berformalin (*formalinized physiological saline*) ke dalam 5 ml dari salah satu kultur di atas.
- Pipet 0,5 ml larutan *Salmonella Polyvalent flagellar (H)* antisera dan masukkan ke dalam tabung serologi ukuran 10 x 75 mm.
- Tambah 0,5 ml antigen yang akan diuji.

- e) Siapkan larutan garam fisiologis kontrol dengan mencampurkan 0,5 ml larutan garam fisiologis berformalin dengan 0,5 ml antigen berformalin (*formalinized antigen*).
- f) Inkubasikan kedua campuran tersebut dalam penangas air pada temperatur 48 °C sampai dengan 50 °C.
- g) Amati adanya penggumpalan setiap 15 menit selama 1 jam.
- h) Hasil uji positif ditandai dengan adanya penggumpalan, sedangkan pada kontrol tidak terjadi penggumpalan.

4.5.5 Interpretasi hasil *Salmonella* spp.

Interpretasi hasil uji biokimia *Salmonella* spp. dapat dilihat pada Tabel 4, sedangkan untuk kriteria penentuan non *Salmonella* spp dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 4 - Reaksi biokimia *Salmonella*

No	Uji substrat	Hasil reaksi		
		Positif	Negatif	<i>Salmonella</i>
1	Glukosa (TSI)	Tusukan kuning	Tusukan merah	+
2	Lysine Dekarboksilase(LIA)	Tusukan ungu	Tusukan kuning	+
3	H ₂ S (TSI dan LIA)	Hitam	Tidak hitam	+
4	Urease	Pink sampai merah	Tetap kuning	-
5	Lysine Dekarboksilase Broth	Warna ungu	Warna kuning	+
6	<i>Phenol Red Dulcitol Broth</i>	Warna kuning dan atau dengan gas	Tanpa berubah warna dan tanpa terbentuk gas	a)
7	KCN Broth	Ada pertumbuhan	Tidak ada pertumbuhan	-
8	Malonat Broth	Warna biru	Tidak berubah warna	b)
9	Uji indol	Permukaan warna merah	Permukaan warna kuning	-
10	Uji <i>Polyvalent flagelar</i>	Aglutinasi	Tidak aglutinasi	+
11	Uji <i>Polyvalent Somatic</i>	Aglutinasi	Tidak aglutinasi	+
12	<i>Phenol Red Lactose Broth</i>	Warna kuning dengan/tanpa gas	Tidak terbentuk gas dan tidak berubah warna	-
13	<i>Phenol Red Sukrosa Broth</i>	Warna kuning dengan/tanpa gas	Tidak terbentuk gas dan tidak berubah warna	-
14	Uji <i>Voges-Proskauer</i>	pink sampai merah	Tidak berubah warna	-

Tabel 4 – Lanjutan

No	Uji substrat	Hasil reaksi		
		Positif	Negatif	<i>Salmonella</i>
15	Uji <i>Methyl Red</i>	Merah menyebar	Warna kuning menyebar	+
16	<i>Simmon's</i> sitrat	Pertumbuhan warna biru	Tidak ada pertumbuhan dan tidak ada perubahan	V
KETERANGAN : a) Mayoritas dari kultur <i>S.arizonae</i> adalah negatif b) Mayoritas dari kultur <i>S.arizonae</i> adalah positif V Variable				

Tabel 5 - Kriteria penentuan non *Samonella spp*

No	Uji substrat	Hasil
1	Urease	Positif (pink – merah)
2	Lysine Dekarboksilase(LIA)	Negatif (Jernih)
3	Lysine Dekarboksilase <i>Broth</i>	Negatif (Jernih)
4	KCN <i>Broth</i>	Positif (ada pertumbuhan keruh)
5	Uji indol	Positif (warna merah pada permukaan)
6	Uji <i>Polyvalent flagelar</i>	Negatif (tidak ada penggumpalan)
7	Uji <i>Polyvalent Somatic</i>	Negatif (tidak ada penggumpalan)
8	<i>Phenol Red Lactose Broth</i>	Positif (warna kuning ada/tidak ada gas)
9	<i>Phenol Red Sukrosa Broth</i>	Positif (warna kuning ada/tidak ada gas)
10	Uji <i>Voges-Proskauer</i>	Positif (warna pink sampai merah)
11	Uji <i>Methyl Red</i>	Negatif (warna kuning menyebar)

KETERANGAN:

- Test Malonate broth positif lebih lanjut untuk mengamati jika biakan tersebut *Salmonella Arizona*.
- Jangan dibuang biakan positif jika pada LIA menunjukkan reaksi bercirikan *Salmonella*, test lebih lanjut untuk mengamati jika spesies *Salmonella*

4.6 Pengujian *Campylobacter* spp.**4.6.1 Prinsip**

Pertumbuhan *Campylobacter* pada media selektif melalui tahapan pra-pengayaan, pengayaan, isolasi dan identifikasi serta konfirmasi.

4.6.2 Media dan reagen

- Campylobacter enrichment broth*
Bolton broth base 1000 ml ditambah 50 ml *lysed horse blood* ditambah 2 vial *Bolton* antibiotik;
- agar isolasi *Campylobacter*

- Abeyta-Hunt-Bark* (AHB) dan modified *Campy blood-free Agar* (mCCDA);
- c) media konfirmasi *Campylobacter broth* (*broth enrichment*, bebas antibiotika), dengan atau tanpa *Foetal Bovine Serum* (FBS);
 - d) *heart infusion agar* ;
 - e) pepton 0,1 %;
 - f) brucella agar, semi-solid;
 - g) TSIA;
 - h) *oxidative fermentasi test media*;
 - i) *Mac Conkey Agar*;
 - j) glycine;
 - k) natrium dan *cystein chlorida*;
 - l) kalium nitrat;
 - m) reagen deteksi nitrit;
 - n) reagen natrium hipurat;
 - o) reagen *Ninhydrin* ;
 - p) kertas strip Pb asetat;
 - q) kertas saring strip yang dibasahi larutan Pb asetat jenuh dan kering;
 - r) larutan *Netral Red*;
 - s) kertas cakram yang mengandung *Nalidixic acid* dan *Cephalothin*;
 - t) hidrogen peroksida 3 %;
 - u) reagen Oksidase;
 - v) reagen pengecatan *Gram* (S6) dengan 5 % *carbol fuchsin* (S4) sebagai pewarna.
 - w) isolat *Campylobacter* spp untuk kontrol positif.

4.6.3 Peralatan

- a) tabung 10 x 75 mm;
- b) Erlenmeyer 250, 500 ml dan 50 ml;
- c) gelas obyek dan penutup ;
- d) botol sentrifus 250 ml dan tabung sentrifus 50 ml steril atau yang sejenis;
- e) sistem pengocok gas dari gelas (*Erlenmeyer vacuum system*);
- f) *stomacher*;
- g) mikroskop perbesaran 100 x dan minyak emersi;
- h) blender mekanik/blender jar;
- i) timbangan;
- j) sentrifus berpendingin;
- k) *steril tounge depressor* dan swab;
- l) *anaerobic jars* dengan *gas generating envelopes*;
- m) *shaking gas flask system/gas tank system* (5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂);
- n) inkubator: 25 °C; 30 °C; 35 °C sampai dengan 37 °C dan 42 °C;
- o) kertas saring 0,65 µm, 47 mm (*millipore/genex*);
- p) kertas cakram;
- q) forcep tangkai panjang;

4.6.4 Penyiapan contoh

- a) Timbang dan haluskan contoh daging, sebanyak 25 g dan ditambah 100 ml pepton 0,1 %, kemudian disentrifus dingin 16.000 rpm selama 15 menit, kemudian buang supernatannya.
- b) Ukur contoh susu sebanyak 25 ml kemudian disentrifus dingin 20.000 rpm selama 40 menit, kemudian disaring dan dibuang supernatannya.
- c) Timbang contoh kuning telur sebanyak 25 g dan tambahkan 100 ml *enrichment broth* (*Bolton broth base* 1.000 ml ditambah 50 ml *lysed horse blood* ditambah 2 vial *Bolton*

antibiotik) kemudian dihomogenkan.

- d) Pindahkan 3 ml endapan a) atau b) ke dalam botol sentrifus steril yang berisi 100 ml *enrichment broth* (*Bolton broth base* 1.000 ml ditambah 50 ml *lysed horse blood* ditambah 2 vial *Bolton* antibiotik)

4.6.5 Cara uji

4.6.5.1 Pra pengayaan (metode modifikasi *Park dan Humphrey*)

Inkubasikan suspensi 4.6.4 c) atau d) pada temperatur 37 °C selama 4 jam dalam kondisi mikroaerobik dengan *Gas Tank System*.

4.6.5.2 Pengayaan

Naikkan temperatur inkubasi suspensi 4.6.5.1 menjadi 42 °C selama 23 jam sampai dengan 24 jam, dan 48 jam untuk contoh susu.

4.6.5.3 Isolasi

- a) Suspensi 4.6.5.2 dibuat pengenceran 1 : 100 (0,1 ml masukkan ke dalam 9,9 ml pepton 0,1 %).
- b) Goreskan masing-masing 2 ose dari suspensi 4.6.5.2 dan 4.6.5.3 a) pada media agar *AHB* atau *mCCDA*.
- c) Inkubasikan pada temperatur 42 °C selama 24 jam sampai dengan 48 jam dalam *Gas Tank System*. Amati pertumbuhan pada inkubasi 24 jam.

4.6.5.4 Identifikasi

- a) Koloni berbentuk bulat atau tidak beraturan dengan tepi halus dan berwarna putih translusen dengan pertumbuhan menyebar.
- b) Pilih minimal 1 koloni dari tiap cawan Petri dan siapkan pada gelas obyek. Lihat bentuk sel bakteri dibawah mikroskop dengan minyak emersi. Sel *Campylobacter* terlihat berbentuk koma atau melengkung, panjang 1,5 – 5 µm dan dengan formasi zigzag. *Campylobacter* umumnya motil dan 20 % *C. jejuni* adalah tidak motil. Sel yang sudah tua dan cedera (*injured*) akan mengalami penurunan motilitas dan terjadi perubahan bentuk menjadi bulat.
- c) Pengujian selalu disertai dengan kontrol positif.

4.6.5.5 Konfirmasi dan uji biokimia

Setiap pengujian selalu disertai dengan kontrol positif.

4.6.5.5.1 Uji katalase

- a) Ambil koloni positif *Campylobacter* kemudian teteskan *hydrogen peroxide* 3 % dan apabila timbul gelembung maka koloni positif *Campylobacter*.
- b) Jika koloni positif pada uji katalase, dipindahkan ke dalam dua media *Campylobacter confirmation broth* (Formulasi 1 dan Formulasi 2). Satu menggunakan *FBS* dan satu tanpa *FBS*. Inokulasikan koloni ke dalam kedua media di atas, dan inkubasikan pada

temperatur $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam pada kondisi mikroaerobik (*Gas Tank System*) hingga keduanya kelihatan keruh.

- c) Jika pertumbuhannya sudah cukup, gunakan kultur *broth* tanpa *FBS* untuk uji biokimiawi selanjutnya.

4.6.5.5.2 Uji sensitifitas antibiotik

- a) Inokulasikan kultur secara merata pada permukaan media *Heart Infusion Agar* yang mengandung 5 % darah dan 0,35 % *FBS* dengan menggunakan swab steril.
- b) Letakkan kertas cakram *Cephalothin* dan *Nalidixic acid* di atas media.
- c) Inkubasikan media pada temperatur $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam sampai dengan 48 jam dengan kondisi mikroaerobik.
- d) Lihat adanya zona inhibisi yang mengelilingi kertas cakram. Adanya zona mengindikasikan sensitifitas bakteri terhadap antibiotik tersebut. *Campylobacter jejuni* sangat sensitif terhadap *Nalidixic acid* dan resisten terhadap *Cephalothin*.

4.6.5.5.3 Pengecatan Gram

Pada pengecatan Gram *Campylobacter spp* berbentuk koma dan termasuk Gram negatif.

4.6.5.5.4 Uji hippurate hydrolysis

- a) Buat emulsi dengan ose diameter 2 mm antara koloni yang tumbuh dari media *Heart Infusion Agar* yang digunakan pada uji sensitifitas antibiotik dengan menambahkan 0,4 ml *hippurate solution* dalam tabung 10 x 75 mm.
- b) Inkubasikan pada temperatur $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ dalam selama 2 jam dalam penangas air. Tambahkan 0,5 ml reagen *Ninhydrin* sambil diaduk. Inkubasikan kembali selama 10 menit. Lihat segera perubahan pada tabung.
- c) Reaksi positif bila terjadi perubahan media menjadi violet dengan jelas. *Campylobacter jejuni* menunjukkan reaksi positif pada uji *hippurate hydrolysis*.

4.6.5.5.5 Uji dengan TSIA

- a) Inokulasikan pada media *TSIA* dari kultur *broth* dengan cara menusuk sebagian tegak dan menggoreskan pada bagian miring.
- b) Inkubasikan pada temperatur $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ sampai dengan $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 5 hari dengan kondisi mikroaerobik dalam *Gas Tank System*. *Campylobacter jejuni* pada media *TSIA* bagian tegak dan miring berwarna merah (basa) dengan tidak memproduksi H_2S .

4.6.5.5.6 Uji glucose utilization

- a) Inokulasikan 2 tabung media uji *oxidative-fermentative* yang sudah diinokulasi dengan kultur. Satu tabung berisi glukosa, dan yang satu tanpa glukosa.
- b) Inkubasikan pada temperatur $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ sampai dengan $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 4 hari dengan kondisi mikroaerobik dalam *Gas Tank System*. *Campylobacter spp* tidak menggunakan glukosa atau gula lainnya, ditandai dengan tidak adanya perubahan media pada tabung.

4.6.5.5.7 Uji katalase-oxidase

- a) Inokulasikan kultur dari media broth ke dalam media *Heart Infusion Agar* miring, dan inkubasikan pada temperatur 35 °C sampai dengan 37 °C selama 48 jam.
- b) Ambil koloni yang tumbuh pada agar miring dan teteskan *hydrogen peroxide* 3 %.
- c) Tambahkan reagen oksidasi ke dalam kultur media *Heart Infusion Agar* miring. Jika media berubah menjadi ungu, maka kultur positif uji oksidasi. *Campylobacter jejuni* positif pada uji katalase dan oksidase.

4.6.5.5.8 Uji growth temperature tolerance

- a) Campur 2 ml kultur broth dengan *Peptone* 0,1 % dengan tingkat kekeruhan menggunakan standar *McFarland* Nomor 1. Goreskan media ke dalam 3 cawan Petri media *Heart Infusion–Blood–FBP Agar*.
- b) Inokulasikan pada masing-masing cawan Petri. Inkubasikan satu cawan pada temperatur 25 °C, satu cawan pada temperatur 35 °C sampai dengan 37 °C dan yang satu lagi pada temperatur 42 °C selama 3 hari dengan kondisi mikroaerobik dalam *Gas Tank System*.
- c) Uji positif ditandai adanya kekeruhan pada inokulum *Campylobacter jejuni* tidak tumbuh pada temperatur 25 °C, tetapi tumbuh baik pada temperatur 35 °C sampai dengan 37 °C dan 42 °C.

4.6.5.5.9 Uji pertumbuhan pada MacConkey Agar

Goreskan satu koloni pada *MacConkey Agar*, inkubasikan pada temperatur 37 °C selama 3 hari dengan kondisi mikroaerobik dalam *Gas Tank System*. *Campylobacter jejuni* tumbuh baik pada *MacConkey Agar*.

4.6.5.5.10 Uji pertumbuhan

Uji ini menggunakan *Brucella broth* dengan 0,18 % agar. Pipet media tersebut sebanyak 7 ml per tabung, teteskan 0,1 ml kultur, dan ratakan di atas permukaan media semi-solid. Inkubasikan pada temperatur 35 °C sampai dengan 37 °C selama 5 hari.

a) Uji pertumbuhan pada glycine 1 %

Inokulasikan kultur pada media 1 % glycine, *Campylobacter jejuni* tumbuh (positif).

b) Uji pertumbuhan pada NaCl 3,5 %

Inokulasikan kultur pada media NaCl 3,5 %, *Campylobacter jejuni* tidak tumbuh (negatif).

c) Uji H₂S dari cysteine

Inokulasikan kultur pada media *cysteine*. Koloni *Campylobacter jejuni* berwarna kehitaman dan mengkilat.

d) Reduksi nitrat

Inokulasikan kultur pada media nitrat. Setelah 5 hari tambahkan nitrit reagen A dan B.

Campylobacter jejuni menunjukkan reaksi positif dengan terbentuknya warna merah.

Reaksi biokimia *Campylobacter jejuni* dan *Campylobacter spp* dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6 - Perbandingan karakteristik spesies *Campylobacter*

Karakteristik	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. laridis</i>	<i>C. fetus fetus</i>	<i>C. cinaedi</i>	<i>C. fennelliae</i>	<i>C. cyraerophila</i>	<i>C. hyointestinalis</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+	
Resistensi terhadap Cephalothin	R	R	R	S	S	S	S	S	S
Resistensi terhadap Nalidixic acid	S	S	R	R	S	S	S	R	S
Hippurate hydrolysis	±	+	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S dari TSIA	-	d	-	-	-	-	-	+	-
Glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalase-Oksidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tumbuh pada									
25 °C	-	-	-	+	-	-	+	d	-
35 °C-37 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42 °C	+	+	+	d	d	d	-	+	+
MacConkey		+	+	+	-	-	-	+	-
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tumbuh pada glycine 1 %	+	+	+	+	+	+	-	+	+
NaCl 3,5 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S dari cystein	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reduksi nitrat	+	+	+	+	+	-	+	+	+

KETERANGAN

(+) adalah positif;

(-) adalah negatif;

(d) adalah positif atau negatif;

R adalah resisten;

S adalah sensitif.

4.7 Pengujian *Listeria monocytogenes*

4.7.1 Prinsip

Metode pengujian ini didasarkan pada isolasi dan identifikasi bakteri *Listeria monocytogenes* dengan cara pembiakan pada media selektif.

4.7.2 Media dan reagen

- a) BPW 0,1 %;
- b) *Buffered Listeria Enrichment Broth (BLEB)*;
- c) *Listeria Enrichment Broth Base (LEBB)*;
- d) *Selective Enrichment Supplement (SES)*;
- e) *Listeria Selective Agar (LSA)*;
- f) *Listeria Selective Supplement LSS*;
- g) *Oxford Agar (OXA)*;
- h) *PALCAM Agar (PALCAM)*;
- i) *Modified Oxford Agar (MOX)*;
- j) *Lithium chloride-Phenylethanol-Moxalactam (LPM) agar*;
- k) *Trypticase Soy agar dengan Yeast extract (TSAy)*;
- l) antibiotik *Cycloheximide* atau *Natamycine*;
- m) agar darah domba/kuda;
- n) media semisolid;
- o) pereaksi H_2O_2 3 %;
- p) Manitol;
- q) Xylosa;
- r) Rhamnosa;
- s) Pengecatan *Gram*;
- t) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923;
- u) *Rhodococcus equi* ATCC 6939.

4.7.3 Peralatan

- a) cawan petri;
- b) tabung *Craigie*;
- c) tabung reaksi;
- d) pipet volumetrik;
- e) *Erlenmeyer*;
- f) botol media;
- g) gunting;
- h) pinset;
- i) jarum inokulasi (*ose*);
- j) *stomacher*;
- k) mikroskop;
- l) pembakar bunsen;
- m) pH meter;
- n) timbangan;
- o) *magnetic stirrer*;
- p) pengocok tabung (*vortex*);
- q) inkubator temperatur $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- r) inkubator temperatur $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- s) penangas air;
- t) autoklaf;
- u) lemari steril (*clean bench*);
- v) lemari pendingin (*refrigerator*);
- w) *freezer*.

4.7.4 Penyiapan contoh

- a) Timbang contoh padat dan semi padat sebanyak 25 gram atau ukur contoh cair sebanyak 25 ml secara aseptik, kemudian masukkan dalam wadah steril.

SNI 2897:2008

- b) Untuk contoh daging dan telur (padat dan semi padat)
 Tambahkan 225 ml *Buffered Listeria Enrichment Broth* ke dalam kantong steril yang berisi contoh, homogenkan dengan *stomacher* selama 1 menit sampai dengan 2 menit.
- c) Untuk contoh susu (cair)
 Tambahkan 225 ml *Buffered Listeria Enrichment Broth* ke dalam kantong atau wadah steril yang berisi contoh, homogenkan.

4.7.5 Cara uji

Pengujian selalu disertai dengan kontrol positif.

4.7.5.1 Pra pengayaan

Inkubasikan suspensi 4.7.4 b) atau c) pada temperatur 30 °C selama 4 jam.

4.7.5.2 Pengayaan

Lanjutkan inkubasi suspensi 4.7.5.1 sampai dengan 48 jam dengan menambahkan antibiotik *Cycloheximide* atau *Natamycine* dengan konsentrasi 25 mg/liter.

4.7.5.3 Isolasi

- a) Setelah diinkubasikan 24 jam dan 48 jam, masing-masing goreskan 1 ose suspensi 4.7.5.2 pada *OXA* atau *PALCAM* atau *MOX* atau *LPM*.
- b) Inkubasikan media *OXA*, *PALCAM*, dan *MOX* pada temperatur 35 °C selama 24 jam sampai dengan 48 jam, sedangkan media *LPM* diinkubasikan pada temperatur 30 °C selama 24 jam sampai dengan 48 jam.
- c) Pada media *LPM* koloni *Listeria* terlihat berwarna abu-abu kebiruan atau putih.
- d) Pada *OXA* dan *PALCAM* koloni berwarna hitam dikelilingi zona jernih.
- e) Pada agar darah domba/kuda bakteri *Listeria monocytogenes*, tampak cekung dibagian tengahnya, berwarna abu-abu kebiruan, dikelilingi zona jernih (karena adanya sifat hemolisa dari *Listeria monocytogenes*).

4.7.5.4 Identifikasi

Tumbuhkan koloni *Listeria* pada media *TSAy*, kemudian inkubasikan pada temperatur 30 °C selama 24 jam sampai dengan 48 jam.

4.7.5.4.1 Uji pengecatan Gram

Bakteri *Listeria monocytogenes* merupakan bakteri Gram positif sehingga menunjukkan sel berwarna violet pada pemeriksaan mikroskopik.

4.7.5.4.2 Uji motilitas

- a) Menggunakan media semi-solid dalam tabung yang didalamnya terdapat tabung *Craigie*. Isolat yang diuji dan diinokulasi dalam tabung *Craigie*.
- b) Inkubasikan pada temperatur 37 °C selama 24 jam.

- c) Uji motilitas positif, bila terdapat bakteri *Listeria monocytogenes* di permukaan agar semi-solid di luar tabung *Craigie*.

4.7.5.4.3 Uji gula-gula

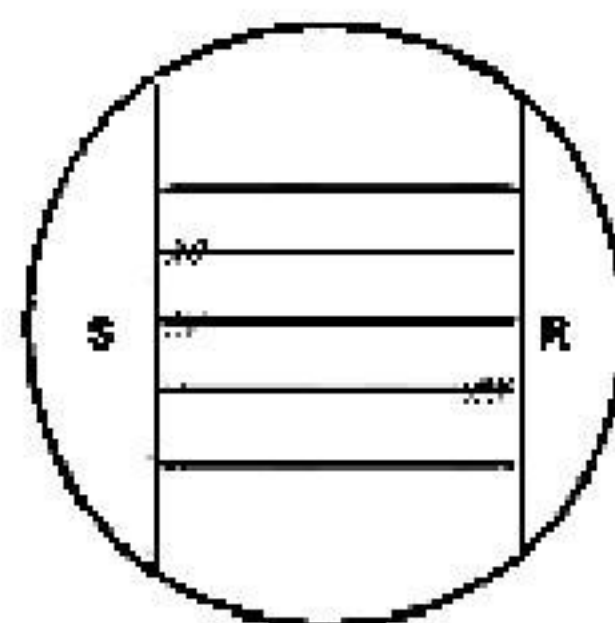
- a) Ambil koloni dari media agar darah domba/kuda yang diduga *Listeria monocytogenes*, dan inokulasikan pada media yang mengandung karbohidrat yang sudah disiapkan (glukosa, maltosa, manitol, rhamnosa, dan xylosa).
- b) Inkubasikan pada temperatur 37 °C selama 24 jam.
- c) Hasil uji positif apabila media gula-gula di atas berubah warna dari merah menjadi kuning.
- d) Hasil uji negatif apabila media gula-gula tetap berwarna merah.

4.7.5.4.4 Uji katalase

- a) Campurkan koloni yang diduga *Listeria monocytogenes* dengan satu tetes pereaksi H₂O₂ 3 % pada kaca preparat hingga rata.
- b) Reaksi katalase positif apabila terbentuk gelembung pada campuran sel tersebut.
- c) Reaksi katalase negatif apabila tidak terbentuk gelembung pada campuran sel tersebut.

4.7.5.5 Uji konfirmasi

- a) Untuk konfirmasi aktivitas hemolitik *Listeria monocytogenes* (β-hemolise), dilakukan dengan *CAMP test*.
- b) Inokulasikan koloni yang diduga *Listeria monocytogenes* pada media agar darah domba/kuda yang memakai biakan *Staphylococcus aureus* dan *Rhodococcus equi* seperti terlihat pada Gambar 1.
- c) Inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 24 jam dan 48 jam.
- d) *CAMP test* dinyatakan positif *Listeria monocytogenes*, apabila zona hemolisis berada di sekitar goresan *Staphylococcus aureus*.



KETERANGAN S = *Staphylococcus aureus*, R = *Rhodococcus equi*
 ### = β hemolisa

Gambar 1 - CAMP test *Listeria monocytogenes*

Interpretasi hasil uji *Listeria monocytogenes* dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7 - Interpretasi hasil uji *Listeria monocytogenes*

No.	Jenis Uji	Hasil Uji	Keterangan
a	Pengecatan <i>Gram</i>	Positif	Batang pendek
b	Motilitas	Positif	Terdapat bakteri <i>L. monocytogenes</i> di permukaan agar semi-solid di luar tabung <i>Craigie</i>
c	Glukosa	Positif	Berwarna kuning
d	Maltosa	Positif	Berwarna kuning
e	Manitol	Negatif	Berwarna kuning
f	Rhamnosa	Positif	Berwarna kuning
g	Xylosa	Negatif	Berwarna kuning
h	Uji kalatase	Positif	Terbentuk gelembung
i	<i>CAMP test</i>	positif	Zona hemolisa disekitar goresan <i>Staphylococcus aureus</i>



Lampiran A
(normatif)
MPN seri tiga tabung

Penghitungan tabel *MPN* seri tiga tabung dengan selang kepercayaan 95 % untuk kombinasi hasil positif dan tabung pengenceran yang digunakan (0,1 ml; 0,01 ml dan 0,001 ml) (BAM 2001 atau 2006) sesuai Tabel A.1.

Tabel A.1 - *MPN* seri tiga tabung

Jumlah tabung positif (3 tabung)			MPN / g	Batas kepercayaan 95 %	
0,1 g	0,01 g	0,001 g		Bawah	Atas
0	0	0	< 3,6	-	9,5
0	0	1	3	0,15	9,6
0	1	0	3	0,15	11
0	1	1	6,1	1,2	18
0	2	0	6,2	1,2	18
0	3	0	9,4	3,6	38
1	0	0	3,6	0,17	18
1	0	1	7,2	1,3	18
1	0	2	11	3,6	38
1	1	0	7,4	1,3	20
1	1	1	11	3,6	38
1	2	0	11	3,6	42
1	2	1	15	4,5	42
1	3	0	16	4,5	42
2	0	0	9,2	1,4	38
2	0	1	14	3,6	42
2	0	2	20	4,5	42
2	1	0	15	3,7	42
2	1	1	20	4,5	42
2	1	2	27	8,7	94
2	2	0	21	4,5	42
2	2	1	28	8,7	94
2	2	2	35	8,7	94
2	3	0	29	8,7	94
2	3	1	36	8,7	94
3	0	0	23	4,6	94
3	0	1	38	8,7	110
3	0	2	64	17	180
3	1	0	43	9	180
3	1	1	75	17	200
3	1	2	120	37	420
3	1	3	160	40	420
3	2	0	93	18	420
3	2	1	150	37	420
3	2	2	210	40	430
3	2	3	290	90	1.000
3	3	0	240	42	1.000
3	3	1	460	90	2.000
3	3	2	1.100	180	4.100
3	3	3	> 1.100	420	--

Bibliografi

[BAM] *Bacteriological Analytical Manual*. 2006. Division of Microbiology. U.S. Food and Drug Administration. Gaithersburg, USA : AOAC Internasional.

[BAM] *Bacteriological Analytical Manual*. 2001. Division of Microbiology. U.S. Food and Drug Administration. Gaithersburg, USA : AOAC Internasional.

[FAO] *Food and Agriculture Organization*. 1992. *Manual of Food Quality Control. Microbiological Analysis*. Ed-4. Roma: FAO United Nations.











BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.or.id